

DERLEME

## Kültüre İnsan Keratinosit Üretimi ve Klinik Uygulanımları

Güzin Yeşim ÖZGENEL

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Bursa.

### ÖZET

Geniş yanıklarda ve kronik ülserasyonlarda, derinin rekonstrüksiyonu çözümü zor bir problemdir. Ototolog deri greftleri deri rekonstrüksiyonunda en ideal çözümdür. Ancak geniş yanık vakalarında yeterli otogreft verici alan olmaması nedeniyle kalıcı yara örtümü sağlanmasında zorlukla karşılaşılır. Bunun sonucu olarak, hastalar sepsis ya da diğer komplikasyonlar nedeniyle kaybedilebilmektedir. Doku mühendisliğindeki ilerlemeler, kültüre keratinositlerden otolog epitelyum elde edilmesini sağlamıştır. Kültüre epidermal otogreft elde etme tekniği pahalı olmasına rağmen, geniş yanık vakalarında kısa sürede kalıcı örtüm sağlanması nedeniyle hayat kurtarıcıdır. Özellikle yanık tedavisinde insan keratinosit kültürünün önemli bir yeri olması nedeniyle bu yazıda kültüre keratinosit elde etme tekniği, kullanım şekilleri ve klinikte kullanım alanları gözden geçirildi.

**Anahtar Kelimeler:** Keratinosit kültürü. Yanık. Doku kültürü. Hücre transplantasyonu.

### Production of Cultured Human Keratinocyte and Clinical Applications

#### SUMMARY

Reconstruction of skin has been a challenging problem for surgeons in massive burns and chronic ulcerations. Autologous skin grafts are the ideal solution in reconstruction. In patients with extensive burns, surgeons often face difficulties in providing adequate permanent wound coverage because of inadequate donor autograft area. As a result of this, patients may be die of sepsis or other complications. The process in tissue engineering has led to harvest autologous epithelium by cultured keratinocytes. Although the technique of harvesting cultured epidermal autograft is expensive, grafting patients who are extensively burned with cultured epidermal autografts has been a life-saving measure. Since cultured human keratinocytes are valuable tool especially in burn care, in this paper, the technique of harvesting cultured keratinocytes, cultured skin substitutes and their clinical use were reviewed.

**Key Words:** Keratinocyte culture. Burn. Tissue culture. Cell transplantation.

Geniş cilt defektlerinin rekonstrüksiyonu cerrahide karşımıza çıkan önemli bir problemdir. Yıllardır otolog kısmi kalınlıkta deri grefti ile defekt örtümü sağlanmıştır. Ancak bu defekt geniş alanları içerdiğinde örneğin geniş yanıklarda olduğu gibi, greftleme için yeterli verici alan bulunmadığından hemen kalıcı örtüm sağlamak mümkün değildir. Bu durumda en sık kullanılan insan kadavra allogreftleridir. Ancak bu allogreftler geçici yara örtümü sağlamakta ve genellikle 2. haftadan sonra alıcı yatakta immün reaksiyon gelişmesi nedeniyle rejekte edilmektedir.<sup>1-3</sup> Günümüze kadar hayvan derisi, amniotik membran, sentetik deri benzeri maddeler ve biyolojik

polimerler gibi çeşitli örtü materyalleri kullanılmıştır. Ancak bunların hepsi ile sadece geçici yara örtümü sağlanmıştır.<sup>4-6</sup>

Major yanıklı hastalarda, yanığın oluşması ile yanık yaralarının kapatılması arasında geçen süre uzadıkça hastalarda gözlenen komplikasyonların sayısı artmakta ve özellikle sepsis başlıca mortalite nedeni olmaktadır. Son yıllarda, keratinosit kültürü ile greftlenebilir otolog epitel elde edilmesi ve yanık alanlarının bu epitel ile kalıcı şekilde kapatılması yanık tedavisinde yeni bir dönemi başlatmıştır. 1975 yılında Howard Green ve James G. Rheinwald tarafından geliştirilen “koloni büyüme tekniği” ile birkaç santimetre karelik deri biopsisinden, 3-4 hafta içerisinde bütün vücudu örtecek miktarda kültüre epitel-yum elde etmek mümkün olmuştur.<sup>7-9</sup> Böylece yeterli otogreft verici alan sorunu alternatif bir çözüm getirilmiştir. O tarihten bu yana kültüre epitelin yanık yaralarının kapatılmasında kullanımı gittikçe kabul görmüş ve dünyanın birçok gelişmiş yanık merkezinde rutin uygulamaya sokulmuştur.

Geliş Tarihi: 05.01.2004  
Kabul Tarihi: 17.03.2004

Dr. Güzin Yeşim ÖZGENEL,  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.,  
El Cerrahisi Bilim Dalı,  
16059 Görükle / Bursa  
Tel: 0224 442 81 93  
Faks: 0224 442 80 79  
E-mail: gozgenel@yahoo.com

## Koloni Büyüme Tekniği

Kültür ortamında keratinositler koloni oluşturmak için fibroblast varlığına ihtiyaç duyarlar. Keratinosit üretimi sırasında fibroblast proliferasyonu kontrol altında tutulmalıdır. Aksi takdirde epidermal hücre popülasyonunun üzerine çıkar ve keratinositlerin üremesini baskılar. 3T3 fare fibroblast kullanımı ile bir yandan fibroblastların aşırı çoğalımı baskılanırken, diğer yandan tek hücreden epidermal hücre koloni gelişimi sağlanır. Sonuçta keratinositlerden çok katlı yassı hücreli epitel içeren koloniler oluşur. Koloniler, tripsin ve EDTA ile tek hücrelere indirgenir. Bu hücreler tekrar 3T3 fare fibroblast hücreleri ile muamele edilerek ikinci kültürleri elde edilir. Ancak bir kısım keratinositlerden bölünme yeteneği olmayan ve indirgeyici ajanlara karşı dirençli hücrelerden oluşan koloniler gelişir. Bu tip koloniler çoğaldıkça keratinositlerin kültür yaşam süresi kısalmaktadır. Ayrıca verici kişilerin yaşları arttıkça da kültür yaşam süresi kısalmaktadır.<sup>7</sup> Kültür ortamına eklenen epidermal büyüme faktörü, bölünme yeteneği gösteren hücrelerin terminal differansiasyon gösteren hücrelere dönüşüm süresini uzatarak kültür yaşam süresini uzamaktadır.<sup>8</sup> Sonuçta tek kültüre hücrelerden çok tabakalı koloniler oluşur ve bu koloniler birleşerek epidermise benzer epitelyumu meydana getirir. Dispaz enzimi epitelyal hücre tabakasını kültür ortamından bir bütün şerit halinde ayrılmasını sağlar.<sup>9</sup>

Keratinosit üretiminde en önemli sorun, kültürün değişik mikroorganizmalarla kontaminasyonudur. Üç-dört haftalık kültür işlemi boyunca asepsi kurallarına dikkat edilmemesi kültürün kontamine olmasına ve işlemin başarısızlıkla sonuçlanmasına yol açar. Keratinosit kültür üretimi için doku kültür laboratuvarları gerekmektedir. Laboratuvarlarda yapılan işlemlerin tamamı steril laminar akımlı çalışma kabinlerinde yapılmalıdır.

## Kültüre Epitelyumun Klinikte Kullanım Şekilleri

### 1. Kültüre Epidermal Ototogreft (KEO)

Epidermisin yerine geçebilecek en ideal yapı hastanın kendi epidermidir. 2-4 cm<sup>2</sup>'lik deri biopsisinden elde edilen keratinositlerin in vitro koşullarda ve seri halde kültürü ile 3-4 hafta içerisinde, greftlenebilir kalitede, tabaka halinde ve tüm vücut yüzey alanını örtebilecek miktarda epitel elde etmek mümkündür.

KEO uygulanan alanlar histolojik olarak incelendiğinde; transplantasyondan 6 gün sonra epidermiste orta derecede hipertrofi görülür. Dermo-epidermal birleşke oluşmaya başlar. Hemidesmozomlar, bazal lamina ve tutunucu fibriller greftin yaraya yapışma yüzeyi boyunca birbirine bağlı olarak gelişir. Dermo-

epidermal birleşke oluşumu 3 ile 4. haftalar içerisinde tamamlanır. Tutunucu fibrillerin tam maturasyonu için 1 yıldan fazla süreye ihtiyaç vardır. Stratum germinativum tabakası 6 hafta ile 1 yıl içerisinde oluşmaya başlar. Greftin altında yer alan konnektif doku normal skar dokusu oluşturacak şekilde iyileşir. 4-5 yıl içerisinde normal dermise benzer. Langerhans hücreler 1 hafta içerisinde belirir. 2-6 ay içerisinde normal yoğunluğuna erişir. Melanositler transplantasyon esnasında vardır. Ancak fonksiyonel değildir.<sup>10</sup>

KEO'in avantajları, istenilen miktarlarda otolog epitel elde edilebilir. Dondurularak saklanabilir ve donör saha morbiditesi minimaldir. Dezavantajları ise, yeterli epitelyal tabaka elde etmek için 3-4 haftalık bir süre gerekir. Dermo-epidermal birleşkenin immatür olmasından dolayı greft frajildir. Greft tutma insidansı düşüktür. Geç dönemde, greftlenen alanda spontan bül oluşumu ve greft kaybı görülür. Bu komplikasyonlarla özellikle KEO'in geniş dermal kaybı olan alanlara uygulandığı zaman karşılaşılar. Bu alanları tekrar greftlemek gerekir. Ayrıca kontür defektlerini düzeltmez. Ek olarak maliyeti çok yüksek bir tekniktir. Sonuçta, KEO sadece epidermal örtü sağlar, dermisin yerini almaz.<sup>11</sup>

### 2. Kültüre Epidermal Allogreft (KEA)

Birkaç cm<sup>2</sup>'lik deri biopsi parçasından yeterli miktarda kültüre epitelyal tabaka elde etmek için geçen süre yaklaşık olarak 3 ile 4 hafta arasındadır.<sup>9</sup> Bu gecikmenin üstesinden allojenik hücre ve deri kullanılarak gelinebilir. Kültüre epitel canlı olarak dondurulabilir ve daha sonra hastalara uygulanmak üzere saklanabilir. Dondurulmuş kültüre allojenik keratinosit şeritler canlı allogreftler gibi yara iyileşmesinde etkili olurlar.<sup>12-17</sup>

İnsan hücrelerinde en önemli transplantasyon antijeni Langerhans hücrelerinde bulunan HLA-DR'dir. Bu antijen keratinositlerde bulunmaz. KEA primer olarak keratinositlerden oluşmasına rağmen kalıcı örtüm sağlayamazlar. Yapılan çalışmalarda kültüre allogreftlerin hızlı bir şekilde alıcı yataktaki epidermal hücreler tarafından işgal edildiği gösterilmiştir.<sup>18,19</sup> Bunun yanı sıra, KEA ile tedavi edilen olgularda, allojenik hücrelerin yara zemininde ve kenarında bulunan otolog keratinositlerin proliferasyonunu ve differensiasyonunu stimüle ettiği de bilinmektedir. Bu stimülasyonu sentezlediği ve salgıladığı sitokin, fibroblast büyüme faktörü, transforming büyüme faktörü beta, fibronektin, laminin ve ekstrasellüler matriks proteinler ile sağlamaktadır. Sonuçta epitelyasyonu hızlandırır ve yara iyileşme süresini kısaltır. İyileşen alanlarda normal pigmentasyon ve daha az oranda eritem görülür. Derin epidermal hücreler içerdiğinden yarada kontraktür görülme potansiyeli de azdır.<sup>20</sup>

## Kültüre İnsan Keratinosit Üretimi ve Klinik Uygulanımları

### 3. Kültüre Kompozit Greft

Kültüre epidermal otogreft ve allojenik dermal greftin kombine uygulanımını içerir. Derin yanığı olan vakalarda, KEO<sup>3</sup> in direkt olarak subkutan doku, yağ, fasya veya kasa uygulanması başarısız sonuç verir. Dermal komponente ihtiyaç duyar. Tam kat yanık olgularında bakteriyel invazyonu, su ve elektrolit, protein kaybını önlemek için yara geçici olarak canlı kadavra allogrefti ile örtülür. Greft yapıştıktan ve vaskülarize olduktan sonra rejeksiyondan önce dermabrazyon yapılır. Sonuçta dermal yatak elde edilir. Üç hafta içinde verici alodermis yeni dermisi yapar. Dermabrazyondan sonra kültüre epitelyal otogreft uygulanır.<sup>21</sup>

### 4. Kültüre alofibroblastlar

Fibroblast proliferer olur ve ekstrasellüler matriks sentezler. Transplante fibroblast, granülasyon doku perisitleri, fibroblast ve otoepidermositlerin proliferasyonu stimüle ederek epitelizasyon süresini kısaltır.<sup>22</sup>

### Kültüre Epitelyal Greft Kaynakları

Kültüre epitelyum, epidermal keratinosit dışında kıl folikülünün dermal kök kılıf hücreleri ve mukozal epitelyal hücrelerden elde edilebilir. Kıl foliküllerinin yapısında dışta dermal kök kılıfı bulunur. Bu kılıf temelde bazal keratinositleri içerir. Bu keratinositler interfoliküler epidermal keratinositlerin yerine geçer. Yara iyileşmesi sırasında, dış kök kılıf hücreleri defektli alana göç eder, böylece epidermal rejenerasyona katkıda bulunur. Bu hücreler kültür ortamında kolayca ve geniş çapta üreme gösterir ve epidermal keratinositlerin oluşturduğu epiteli oluşturur.<sup>23</sup> Mukoza epitel hücreler epidermal keratinositlere göre daha hızlı büyürler. İn vitro ortamda en az 14 gün canlılığını korur. Donor alan morbiditesi yoktur.<sup>24</sup>

### Kültüre Epitelin Klinikte Kullanım Alanları

İlk başarılı klinik uygulama 1981 tarihinde O'Connor ve arkadaşları tarafından iki yanıklı hastada gerçekleştirilmiştir.<sup>25</sup> Gallico ve arkadaşları tarafından da 1984'de yaklaşık olarak total vücut alanının %96'sından fazlası yanık olan iki çocuk olgusunda otolog kültüre epiteli başarı ile kullanılmıştır.<sup>26</sup> En önemli kullanım alanı, yanık hastalarıdır. Kültüre epitel dokunun canlı olarak dondurulup daha sonra hastalara uygulanmak üzere saklanabilmesi, kültüre epitel doku bankası oluşturulup major yanıklı hastaların acil tedavisinde allogreft olarak kullanımını mümkün kılar. Sonuçta hastanın mortalite oranı azalır, verici saha morbiditesi ortadan kalkar. Hastanın hastanede yatış süresi kısalır. Bunun yanı sıra, konjenital dev kıllı nevüs eksizeyonundan sonra olu-

şan cilt defektlerini kapatmak için başarı ile kullanılmıştır.<sup>27</sup> Diğer yandan junctional epidermolizis bülloza, degloving tarzında cilt yaralanmaları ve hipertrofik skar tedavisinde kullanılmaktadır.<sup>28-33</sup> Kronik bacak ülserleri de allojenik kültüre epitel ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilir.<sup>34,35</sup>

### Sonuç

Keratinosit kültürü ilk defa klinikte masif yanık olgularının tedavisinde kullanılmış ve bu olgularda ideal çözüm olarak görülmüştür. Ancak konvansiyonel teknik olan kısmi kalınlıkta deri grefti ile karşılaştırıldığında, greftin dayanıklılığı ve tutma oranı daha düşük olduğu saptanınca, keratinosit konusuna ilgi azalmıştır. Ayrıca keratinosit kültürü tam teşekküllü hastanede Mikrobiyoloji ve Plastik Cerrahi Anabilim Dallarının kombine çalışması ile doku kültür laboratuvarlarında gerçekleştirilmesi gerekir. Keratinosit kültürüne yönelik bir laboratuvarın ortalama maliyeti ise 80 ile 100 milyar arasındadır. Günümüzde keratinosit kültürü hem bu konuda yapılacak araştırmalar hem de klinik kullanımı açısından pahalı gibi görünse de, bu konuda ki gelişmeler deri rekonstrüksiyonunda ideali yakalamada ve verici alan morbiditesini kısıtlamada çözüm olabilir.

### Kaynaklar

1. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat* 1943; 11: 299-309.
2. Jonker M, Hoogeboom J, van Leeuwen A, et al. Influence of matching for HLA-DR antigens on skin graft survival. *Transplantation* 1979; 27: 91-4.
3. Lafferty KJ, Prowse SJ, Simeonovic CJ. Immunobiology of tissue transplantation; a return to the passenger leukocyte concept. *Ann Rev Immunol* 1983; 1: 143-73.
4. Gallico III GG. Biologic skin substitutes. *Clin Plast Surg* 1990; 17: 519-26.
5. Pruitt BA, Levine NS. Characteristics and uses of biologic dressings and skin substitutes. *Arch Surg* 1984; 119: 312-22.
6. Tompkins RG, Burke JF. Progress in burn treatment and the use of artificial skin. *World J Surg* 1990; 14: 819-24.
7. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-43.
8. Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 1977; 265: 421-4.
9. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76: 5665-8.
10. Compton CC, Gill JM, Bradford DA. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Lab Invest* 1989; 60: 600-12.
11. Desai MH, Mlaker JM, Mclauley RL. Lack of long-term durability of cultured keratinocyte burn-wound coverage ; case report. *J Burn Care Rehabil* 1991; 12: 540-5.

12. Luca MD, Albanese E, Bondanza S, et.al. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. *Burns* 1989; 15: 303-9.
13. Roseeuw D, Coninck AD, Neven AM, et.al. Fresh and cryopreserved cultured keratinocyte allografts for wound healing. *Toxic in vitro* 1991; 5: 579-83.
14. Teepe RGC, Koch R, Haeseker B. Randomized trial comparing cryopreserved cultured epidermal allografts with tulle-gras in the treatment of split-thickness skin graft donor sites. *J Trauma* 1993; 35: 850-3.
15. Madden MR, LaBruna AA, Hajjar DP, et.al. Transplantation of cryopreserved cultured epidermal allografts. *J Trauma* 1996; 40: 743-50.
16. Bolivar-Flores J, Poumian E, Marsh-Moreno M, et.al. Use of cultured human epidermal keratinocytes for allografting burns and conditions for temporary banking of the cultured allografts. *Burns* 1990; 16: 3-8.
17. Backere ACJ. Euro skin bank: large scale skin-banking in Europe based on glycerol-preservation of donor skin. *Burns* 1994; 20: 4-9.
18. Kawai k, Ikarashi y, Tomiyama K. Rejection of cultured keratinocyte allografts in presensitized mice. *Transplantation* 1993; 56: 265-9.
19. Philips TJ. Cultured epidermal allografts- a temporary or permanent solution? *Transplantation* 1991;51: 937.
20. Torres MT, Amato D. Controlled Clinical Study of Skin Donor Sites and Deep Partial-Thickness Burns Treated with Cultured Epidermal Allografts. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98: 279-87.
21. Cuono C, Langdon R, McGuire. Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. *Lancet* 1986: 1123-4.
22. Boyce ST. Cultured skin substitutes: a review. *Tissue Engin* 1996; 2: 255-66.
23. Limat A, Breikreutz D. Formation of a regular neo-epidermis by cultured human outer root sheath cells grafted on nude mice. *Transplantation* 1995; 59:1032-8.
24. Ueda M, Hata K, Horie K. The potential of oral mucosal cells for cultured epithelium: a primary report. *Ann Plast Surg* 1995;35:498-504.
25. O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981; 1: 75-8.
26. Gallico III GG, O'Connor NE, Compton CC, et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448-51.
27. Gallico GG, O'Connor NE; Cultured epithelial autograft for giant congenital nevi. *Plast Reconstr Surg* 1989; 84: 646-7.
28. Green H. Cultured cells for the treatment of disease. *Sci Am* 1991; 64-70.
29. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, et.al. Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. *Plast Reconstr Surg* 1989; 84: 1-9.
30. Carter DM, Lin AN, Varghese MC, et.al. Treatment of junctional epidermolysis bullosa with epidermal autografts. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 246-50.
31. Beele H, Naeyaert JM, Monstrey S, et.al. Ulcers in pretibial epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol* 1995; 13: 990-2.
32. Kumagai N, Nishina H, Tanabe H, et.al. Clinical application of autologous cultured epithelia for the treatment of burn wounds and burn scars. *Plast Reconstr Surg* 1988; 82: 99-110.
33. Wood F, Liddiard K, Skinner A, et.al. Scar management of cultured epithelial autograft. *Burns* 1996; 22: 451-4.
34. Leigh IM, Purkis PE, Navsaria HA. Treatment of chronic venous ulcers with sheets of cultured allogenic keratinocytes. *Br J Dermatol* 1987; 117: 591-7.
35. Philips TJ, Kehinde O, Green H, et.al. Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 191-9.